

УДК 577.352.27, 577.29, 577.352.4, 577.113

© Коллектив авторов

БЕЛКОВЫЕ И ПЕПТИДНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ В КЛЕТКУ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И ДНК

Г. Е. ПОЗМОГОВА, Д. Г. КНОРРЕ

Центр "Биоинженерия" Российской академии наук, Москва, 117312

Обобщены литературные данные по разработке и испытанию новых невирусных методов доставки антисмысловых нуклеотидов, ДНК и рибозимов, основанные на применении белковых и пептидных конструкций. Для создания последних используют белки и функциональные фрагменты белков, обладающих способностью прохождения через клеточную мембрану. Описаны исследования транспортных свойств рекомбинантных слитных белков, включающих специальный транслоцирующий домен, который способствует высвобождению интернализированных олиго- или полинуклеотидов из эндосомы.

Ключевые слова: генотерапия, антисмысловые конструкции, доставка олиго- и полинуклеотидов в клетки, белковые конструкции.

ВВЕДЕНИЕ. Генотерапия в широком смысле этого слова предусматривает введение в клетки живого организма олиго- или полинуклеотидного материала с целью воздействия антисмысловых конструкций для подавления функционирования нежелательных генов, либо с целью экспрессии соответствующих генов для получения отсутствующих или производимых в недостаточных количествах продуктов. Задача может состоять в попытке компенсации метаболического дефекта, или в создании внутри клетки поражающего агента, если, например, речь идет об уничтожении раковых клеток. Общей проблемой любого варианта генотерапии является доставка нуклеиновой кислоты или олигонуклеотида к своим мишеням. Это означает доставку к определенным тканям или органам, пересечение плазматической мембраны и доставку к определенной мишени внутри клетки. Антисмысловый олигонуклеотид должен найти ту мРНК или участок хромосомной ДНК, против которой он направлен. Введенный ген должен войти в состав конструкции, способной экспрессировать его продукт. Очевидно, что ген или олигонуклеотид сами по себе этими способностями не обладают. При введении в организм они не попадут преимущественно к нужной ткани или нужному органу, та часть, которая окажется в нужном месте, лишь в незначительной мере сможет пересечь гидрофобную клеточную мембрану. Оказавшись внутри клетки, чужеродная ДНК может локализоваться не там, где это необходимо и, более того, оказаться в лизосомах, где будет разрушена действием нуклеаз.

Проблема доставки олигонуклеотидов в клетки, связанная, в том числе с прохождением отрицательно заряженного олигомера через гидрофобную мембрану, была осознана еще на заре развития антисмысловых подходов. В работах Миллера с соавторами [1,2] было предложено использовать вместо самих олигонуклеотидов их Р-этиловые эфиры или метилфосфонатные аналоги. Проникновение этилфосфонатных аналогов олигонуклеотидов в клетки удалось продемонстрировать в прямых экспериментах с алкилирующим производным нонатимидилата, которое было получено

реакцией 3'-концевого фосфата олигомера с 5'-ОН группой *n*-N-2-хлорэтил-N-метилбензилиденуридина [p(Et)dT]gpUCHRCI. Действительно, оказалось, что такой, лишенный межнуклеотидных отрицательных зарядов, олигомер способен эффективно алкилировать внутриклеточные поли (А) - фрагменты мРНК [3]. В систематических исследованиях В.Г. Будкера с соавторами (см. обзоры [4,5]), было показано, что ДНК или достаточно протяженные олигонуклеотиды образуют в присутствии ионов Mg^{2+} вполне прочные комплексы с лецитиновыми липосомами, которые путем инкапсуляции доставляют нуклеотидный материал внутрь клетки. В дальнейшем было найдено, что на поверхности большого числа клеток присутствуют белки, которые могут специфично алкилироваться производными олигонуклеотидов несущих радикал RCl [6]. Было высказано предположение о наличии специальных рецепторов, с помощью которых происходит доставка олигонуклеотидов и их производных в клетки. Для облегчения проникновения олигонуклеотидов в клетки было также предложено использовать их холестеринные производные. Однако в экспериментах с липосомами было обнаружено, что холестерин залипает в мембране, оставляя олигонуклеотид снаружи от мембраны [7]. Тем не менее, оказалось, что производные олигонуклеотидов, несущие остаток холестерина, существенно лучше проникают в клетки, что дает основание полагать, что и в этом случае перенос через мембрану опосредуется рецептором, скорее всего рецептором холестерина.

За последние годы в ряде исследовательских групп были проведены подробные фармакокинетические исследования плазмид и олигонуклеотидов, в том числе модифицированных. Эти данные подробно представлены, например, в обзоре Махато с соавторами [8]. В этих работах показано, что нативные полинуклеотиды в организме быстро деградируют. Так, плазмидную ДНК при внутривенном введении удается зарегистрировать только в течение 5-10 минут. Для достижения терапевтического эффекта антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды приходится использовать в очень высоких концентрациях (от 5 до 100 μ M), в зависимости от состава и длины олигомеров, а также от типа клеток-мишеней. Таким образом, создание специальных эффективных систем транспорта генов или олигонуклеотидов остается сегодня одним из ключевых вопросов генной терапии.

В настоящее время интенсивно развиваются три основных направления в создании направленных, несущих нуклеотидный материал транспортных систем. Это векторные системы на основе вирусов - вирусные векторы; разнообразные варианты липофекции или липосомального транспорта; и специально сконструированные белковые или пептидные векторы, в том числе адресованные по принципу лиганд-рецептор или антиген-антитело к определенным линиям клеток.

При использовании вирусов для транспорта ДНК существуют два принципиально разных подхода. В одном случае чужеродная ДНК находится вне вирусной оболочки, а вирус играет роль адресующей и эдосомолитической компоненты. Например, в работах Куриела с соавторами [9] и других [10,11] была показана эффективная трансформация клеток плазмидной ДНК с помощью конъюгата аденовирус - полилизин. При ином подходе чужеродную ДНК с помощью генно-инженерных приемов сливают с геномом вируса. Векторы такого типа получены на основе ретровирусов грызунов [12], адено-и аденоассоциированных вирусов [13,14], вирусов осповакцины и герпеса [15]. Такие конструкции и принято называть вирусными векторами. Проблемам их получения, изучению биологических и медицинских свойств, безопасности использования подобных систем в генотерапии посвящены многочисленные исследования, которые достаточно полно представлены в ряде обзоров [12-17].

Использование липосом для транспорта молекул ДНК в клетки-мишени человека *in vivo* имеет ряд привлекательных сторон. Липидная оболочка защищает

полинуклеотиды от ферментативной деградации при контакте с биологическими жидкостями, липосомы неиммуногенны, легко проникают из сосудов к тканям. Как известно, их свойства зависят от липидного состава, размера липосомы или везикулы, природы инкапсулированной молекулы, адресующего лиганда и способа его присоединения. рН-зависимые липосомы, благодаря включению в их состав фузогенных белков, например, гемагглютинаина или HVJ белка вируса Сендай [18], теряют стабильность в слабо кислой среде. Некоторые авторы считают перспективным использовать липосомы именно такого типа для транспорта ДНК и олигонуклеотидов в цитоплазму. В этом случае полинуклеотид должен быстро освободиться от липидной оболочки в эндосоме и с большей вероятностью может оказаться в цитоплазме, не подвергаясь лизосомальной деградации [19-20]. Значительные успехи в этой области связаны с применением для транспорта ДНК катионных липидов, из которых, в сочетании с нейтральными молекулами типа диолеилфосфатидилэтаноламин, формируют катионные везикулы, эффективно удерживающие ДНК за счет электростатических взаимодействий [21-29].

Задача настоящего обзора состояла в анализе последних литературных данных по изучению транспорта олигонуклеотидов и ДНК с помощью пептидов и белковых конструкций. Создание белковых векторов для доставки в клетки чужеродных молекул основано на способности некоторых пептидов и белков проникать через клеточные мембраны. Один из распространенных приемов формирования транспортных комплексов состоит в следующем. Природные белки-лиганды, обладающие аффинностью к определенным классам клеток, химическими конъюгируют с положительно заряженными макромолекулами типа полилизина, гистонов или протамина, [8,30-40]. Такое соединение удерживает некоторое количество олигонуклеотидов или ДНК за счет электростатических сил. Мы предлагаем для этой цели использовать свойство интеркаляторов достаточно прочно, но обратимо связываться с дуплексами и триплексами ДНК, повышая их стабильность [41]. В качестве лигандов, обеспечивающих интернализацию комплексов типа белок-полилизин путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, использовались, например, гликопротеины [30-32], трансферрин [33], антитела [36,37], инсулин [36-38], эпидермальный фактор роста [39], лектин [40]. Доставка в клетки-мишени олиго- и полинуклеотидов (в большей части работ – плазмид, несущих репортерный ген) с помощью таких белковых векторов оказывалась на два - три порядка эффективнее в сравнении с нативной ДНК. Однако, оказалось, что лишь небольшая доля интернализированного нуклеотидного материала достигала цели внутри клетки, в то время как большая часть ДНК не высвобождалась из эндосом и подвергалась лизосомальной деградации. Наглядной иллюстрацией возможности решения этой задачи в рамках концепции белковых векторов может служить работа Фишера и Вильсона [32]. В этой работе в качестве адресующего агента к гепатоцитам использовали химический конъюгат асиалогликопротеина с полилизином. Та же плазида снабжалась функционально активной транслоцирующей субъединицей дифтерийного токсина тоже в виде химического конъюгата с полилизином. Этот рекомбинантный белок получали экспрессией в клетках *Echerichia coli* слитого гена, кодирующего связывающий мальтозу фрагмент и трансмембранный домен дифтерийного токсина. Кроме того, для упрощения химической модификации белка, методом сайт-направленного мутагенеза один остаток триптофана был заменен цистеином. Через этот остаток с помощью бифункционального реагента - сульфосукцинимидного эфира 6-[3'-(2-пиридилдитио) пропионамидо] - гексаноата белок конденсировали с высокомолекулярным полилизином. С помощью этой конструкции осуществлено введение в клетки человека плазмиды, экспрессирующей репортерный ген люциферазы. Было найдено, что эффективность доставки по сравнению с контролями, не имеющими

Было найдено, что эффективность доставки по сравнению с контролями, не имеющими трансмембранного домена, повышалась на два порядка.

Появились первые работы, в которых для доставки нуклеиновых кислот создаются специальные мультидоменные белки. В исследовании Фомина и Велса [35] описан слитный белок, состоящий из трех доменов - одного для обеспечения специфичности к определенным типам клеток; второго - для того, чтобы облегчить выход ДНК из эндосомы; третьего - для связывания ДНК. В данной конструкции роль адресующего агента, обеспечивающего интернализацию всего комплекса по механизму рецептор опосредованного эндоцитоза, играло одноцепочечное антитело к онкогену ErbB-2, суперпродуцирующемуся в ряде опухолей. Второй домен - транслоцирующая субъединица псевдомонадного экзотоксина А. В качестве третьего впервые был применен сайт - специфический, обладающий высокой аффинностью к ДНК фрагмент дрожжевого GAL4 белка. Конструкция испытана для доставки в клетки плазмиды, несущей репортерный ген люциферазы под ранним промотором вируса SV40 и специальную последовательность ДНК для образования комплекса плаزمиды - белок. Зарегистрирована временная экспрессия люциферазы, коррелирующая с количеством внесенного комплекса. Причем она не проявляется, если в конструкции отсутствует либо домен, узнающий клетки, либо домен, ответственный за транслокацию.

Другое направление в поиске эффективных векторов для доставки в клетки олигонуклеотидов связано с использованием коротких синтетических дифильных пептидов. Следует отметить, что такие пептидные векторы не способны направить олигонуклеотиды к определенным клеткам - мишеням, однако их применение позволит в будущем значительно снизить эффективную терапевтическую дозу антисенс олигомеров.

Недавно в работе Морриса с соавторами [42] предложено использовать для доставки олигонуклеотидов в клетки их комплексы со специально сконструированным пептидом. В качестве такового предложен 27-мер структуры (записана в однобуквенном коде) Ac-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-NHCH₂CH₂SH. Этот пептид представляет собой на N-конце (1-17) гидрофобный домен - фрагмент белка gp41 вируса ВИЧ-1, ответственный за сплавление с мембраной. С-конец - гидрофильный домен, взятый из последовательности, ответственной за ядерную локализацию Т-антигена вируса SV-40. Достаточно прочные комплексы с олигонуклеотидами образуются в первую очередь за счет их электростатических взаимодействий с четырьмя остатками лизина и аргинина на С-конце. Используя 18- и 26-звенные олигонуклеотиды, снабженные остатком флуоресцеина, авторы показали, что происходит эффективная доставка в клетки с преимущественно ядерной локализацией. Показано также, что в присутствии пептида олигонуклеотиды не подвергаются расщеплению в сыворотке.

Предложено также [43] проводить олигонуклеотиды через мембрану, используя амфифильный анионный пептид GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA, который является частью N-концевого сегмента HA2 субъединицы гемагглютинина вируса гриппа. Пептид при переходе от нейтральной среды к рН 6 претерпевает конформационный переход, который индуцирует временную пермеализацию плазматической мембраны. В присутствии этого пептида наблюдается проникновение в клетку и последующая диффузия в ядро флуоресцеиновых производных как одонитевых, так и двунитевых олигонуклеотидов.

Большой интерес проявляется в настоящее время к пептидным аналогам антисмысловых олигонуклеотидов (PNA, {-CO-CH₂ N[C(O) CH₂B]-(CH₂)₂-NH-}_n, где В - аденин, гуанин, тимин или цитозин) [44, 45], которые образуют с комплементарными фрагментами нуклеиновых кислот стабильные дуплексы. Однако такие производные не обладают способностью проходить через клеточные мембраны. Описана попытка преодолеть этот барьер путем присоединения PNA к инсулиноподобному фактору IGR1

аналог фактора сохраняет сродство к рецептору IGR1. Конъюгат был синтезирован традиционным методом твердофазного пептидного синтеза. В экспериментах на клетках грызунов BALB/c 3Т3, которые характеризуются сверхэкспрессией инсулинового рецептора, с IGR1-PNA комплексом, меченым ^{14}C или флуоресцеин изотиоцианатом, было зарегистрировано интенсивное поглощение конъюгата. Степень интернализации в этом случае была значительно выше в сравнении с контролем, в котором испытывали либо неконъюгированную PNA, либо не экспрессирующие рецептор клетки (человеческие клетки Jurkat).

Из приведенных данных нетрудно заметить, что при разработке белковых конструкций усиливается внимание к созданию сложных макромолекул. С помощью мультидоменных белковых структур, полученных методами генетической инженерии, проводятся довольно успешные попытки не только обеспечить адресность вектора и его однозначное соединение с ДНК, но и детерминировать продвижение плазмиды внутри клетки. В то же время показана эффективность коротких дифильных аминокислотных последовательностей - пептидных векторов, предложенных недавно для доставки в клетки олигонуклеотидов. Следует отметить, что эффективность этих белковых и пептидных конструкций пока продемонстрирована только в модельных условиях: на примере доставки флуоресцирующих олигонуклеотидных производных или репортерных генов. Ближайшее будущее покажет, в какой мере эти конструкции позволят приблизиться к решению важнейшей проблемы генотерапии и антисмысловой биотехнологии - эффективной направленной доставке олиго- и полинуклеотидов в клетку.

Работа поддержана грантом программы «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении» (№ 08.01.01.05)

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller P. S., Darret J. C., Ts'o P. O. P. (1974). *Biochemistry*. **13**, 4887-4896.
2. Miller P. S., McParland K. D., Jayaraman R., Ts'o P. O. P. (1981). *Biochemistry*. **20**, 1874-1880.
3. Karpova G. G., Knorre D. G., Ryte A. S., Stephanovich L. E. (1980). *FEBS Lett.* **122**, 21-24.
4. Budker V. G., Knorre D. G., Vlassov V. V. (1992). *Antisense Res. Devel.* **2**, 177-184.
5. Кнорре Д.Г., Власов В.В. (1992). *Биоорг. химия*. **18**, 1330-1340.
6. Yakubov L. A., Deeva E. A., Zarytova V. F., Ivanova E.M., Ryte A. S., Yurchenko L. V., Vlassov V. V. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6454-6458.
7. Биченков Е. Е., Будкер В. Г., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лохов С. Г., Савченко Е. В., Теплова Н. М. (1988). *Биол. мембраны*. **5**, 735-741.
8. Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M. (1997). *J. Drug Targeting*. **4**, 337-357.
9. Curiel D. T., Agarwal S., Wagner E., Cotten M. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 8850-8854.
10. Fisher K.J., Wilson, J.M. (1994). *Biochem. J.* **299**, 49-58

10. Fisher K.J, Wilson, J.M. (1994). *Biochem. J.* **299**, 49-58
11. Wu G. Y., Zhan P., Sze L.L., Rosenberg A. R., Wu C. H. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 11542-11546.
12. Vile R. G., Russel S. J. (1995). *Br. Medical Bull.* **51**, 12-30.
13. Yeh P., Perricaudet M. (1997). *FASEB J.* **11**, 615-623.
14. Kremer E. J., Perricaudet M. (1995). *Br. Medical Bull.* **51**. P.31-44
15. Glorioso J. C., DeLuca N. A., Fink D. J. (1995). *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 673-710.
16. Martin C. N. *Evolutios.* (1997). **2**, 1-8.
17. Blaese M., Blanckstein T., Brenner M., Cohen-Maguenauer O., Gansbacher B., Russel S., Sorrentino B., Velu T. (1995). *Cancer Gene Ther.* **2**, 291-297.
18. Kaneda Y., Morishita R., Dzau V. J. (1997). *Ann N Y Acad. Sci.* **811**, 299-308.
19. Cho M. J., Juliano R. (1996). *Tibtech.* **14**, 153-158.
20. Ma D. D., Wei A. Q. (1996). *Leuk. Res.* **20**, 925-930.
21. Rose J.K., Buonocore L., Whitt M. A. (1991) *Biotechniques*, **10**, 520-525.
22. Behr J., Demeneix B., Loeffler J., Perez-Mutul J. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6982-6986.
23. McLachalan G., Davidson H., Davidson D., Dickinson P., Dorin J., Porteous D. (1994). *Biochimica*, **11**, 19-21.
24. Hawley-Nelson P., Ciccarone V., Gebeyehu G., Jessee J., Felgner P. L. (1993) *Focus*, **15**, 73-79.
25. Gao X., Huang L. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 280-285.
26. Felgner J. H., Kumar R., Sridhar C. N., Wheeler C. J., Tsai Y. J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P. L. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**. 2550-2561.
27. Lewis J. G., Lin K.-Y., Kothavale A., Flanagan W. N., Matteucci M. D., DePrince R.B., Mook R. A., Jr., Hendren R. W., Wagner R. W. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3176-3181.
28. Lavigne C, Thierry AR. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 566-71.
29. Kitajima I, Hanyu N, Soejima Y, Hirano R, Arahira S, Yamaoka S, Yamada R, Maruyama I, Kaneda Y. (1997). *J. Biol Chem.* **272**, 27099-27106.
30. Wu G. Y., Wu C.H. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**. 14621-14624.
31. Findeis M. A., Wu G. Y., Wu C.H. (1994). *Methods Enzymol.* **247**, 341-351.
32. K.J.Fisher, J.M.Wilson. (1997). *Biochem.J.* **321**, 49-58.
33. Wagner E., Zenke M., Cotten M., Seng H., Birnstien M. I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3410-3414.
34. Ferkol T., Kaetzel C. S., Davis P. B. (1993). *J. Clin. Invest.* **92**, 2394-2400.
35. Fominaya J., Wels W. (1996). *J Biol. Chem.* **271**, 10560-10568.
36. Hockett B., Ariatti M., Hawtrey A. O. (1990). *Biochem. Pharmacol.* **40**, 253-263.
37. Розенкранц А.А., Ячменев С. В., Соболев А.С. (1990). *Биохимия.* **55**, 493-494.
38. Розенкранц А.А., Смирнова О.А., Соболев А.С. (1996). Тез. докл. Междунар. конф., посвященной памяти акад. А.А. Баева. Москва. с. 59.
39. Chen J. Sticles R. J., Daichendt K. A. (1994). *Hum. Gene Ther.* **5**, 429-435.
40. Cheng P.-W., Yin W. (1994). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **205**, 826-833.
41. Позмогова Г.Е., Чувиллин А.Н (1998). Тез. Докл. VIII Конф. "Новые направления биотехнологии". Москва. 64.

43. *Pichon C., Freulon I., Midoux P., Mayer R., Monsigny M., Roche A. C. (1997). Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7, 335-343.*
44. *Nielson P. E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. (1991). Science 254, 1497-1500.*
45. *Hyrup B., Nielsen P. E. (1996). Bioorganic and Medicinal Chemistry. 4, P.5-23.*
46. *Basu S, Wickstrom E. (1997). Bioconjug. Chem. 8, 481-488.*

PROTEIN AND PEPTIDE CONSTRUCTIONS FOR DNA AND OLIGONUCLEOTIDE DELIVERY IN CELL

POZMOGOVA G. E., KNORRE D. G.

Bioengineering Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow 117312.

The literary data on development and trial of new non-viral methods of antisense nucleotide, DNA and ribozyme delivery based on the application of protein and peptide constructions are summarised. For the creation of peptide constructions the proteins and functional fragments of proteins able to pass through a cellular membrane are used. The special attention is paid to the transport properties of recombinant fusion proteins containing translocation domain.

Key words: gene therapy, antisense constructions, delivery of oligo - and polinucliotides into cells, protein constructions.